

(11)Publication number : 07-298881  
(43)Date of publication of application : 14.11.1995

(51)Int.Cl. C12N 9/48  
C12N 15/09  
//(C12N 9/48  
C12R 1:19 )

(21)Application number : 06-119730 (71)Applicant : TAKARA SHUZO CO LTD  
(22)Date of filing : 10.05.1994 (72)Inventor : NAKURA SATOMI  
TAKADA YUMIKO  
MIURA YUKIKO  
MITSUNAGA KENICHI  
TSUNASAWA SUSUMU  
KATOU IKUNOSHIN

(57)Abstract:

NY	100	Wt	Lbs	Fat	Tot	Gly	Pro	Sto	Crt	Chr	Gls	Gly	Gly	Trp
				B			77							15
The	Ass	100	LE	Nr	Ass	116	Ald	Lys	Arg	Ser	Asn	Gly	His	Leu
			ED				FS							Sn

GLENN STATE COLLEGE  
 1965 1966 1967  
 Vol. 100 No. 100  
 100

[illegible]

MONDIALE UNIONE SCIENTIFICA E LETTERARIA ITALIANA 602  
 MONDIALE UNIONE SCIENTIFICA E LETTERARIA ITALIANA 602

[Date of request for examination] 23.05.2000

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

**BEST AVAILABLE COPY**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-298881

(43) 公開日 平成7年(1995)11月14日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/48				
15/09	Z N A			
// (C 1 2 N 9/48				
C 1 2 R 1:19)		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			審査請求 未請求	請求項の数6 F D (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願平6-119730

(22) 出願日 平成6年(1994)5月10日

(71) 出願人 591038141

資酒造株式会社

京都府京都市伏見区竹中町609番地

(72) 発明者 那倉 里美

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 資酒造  
株式会社中央研究所内

(72) 発明者 ▲高▼田 祐美子

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 資酒造  
株式会社中央研究所内

(72) 発明者 三浦 由記子

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 資酒造  
株式会社中央研究所内

(74) 代理人 弁理士 中本 宏 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ及びその遺伝子

(57) 【要約】

【目的】 耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ（以下、P Gと略記する）をコードする遺伝子、及び該遺伝子を用いる耐熱性P Gの製造方法を提供する。

【構成】 60℃で60分間処理したとき約95%以上の残存活性を保持している耐熱性P G。該P Gをコードする、単離された耐熱性P G遺伝子。特定の単離された該遺伝子にハイブリダイズ可能な耐熱性P G遺伝子。特定の耐熱性P G遺伝子を含有させた組換えプラスミドを導入させた組換え体を培養し、該培養物から耐熱性P Gを採取する耐熱性P Gの製造方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 60℃で60分間処理したとき約95%以上の残存活性を保持していることを特徴とする耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ。

【請求項 2】 請求項 1 記載の耐熱性ピログルタミルペプチダーゼをコードする、単離された耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ遺伝子。

【請求項 3】 配列表の配列番号 1 で表されるアミノ酸配列、又はその一部であって、かつ耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ酵素活性を有する部分をコードする請求項 2 記載の単離された耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ遺伝子。

【請求項 4】 配列表の配列番号 2 で表される塩基配列、又はその一部を有することを特徴とする請求項 3 に記載の耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ遺伝子。

【請求項 5】 請求項 3 に記載の遺伝子にハイブリダイズ可能な、請求項 2 に記載の耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ遺伝子。

【請求項 6】 請求項 2 に記載の耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ遺伝子を含む組換えプラスミドを導入させた組換え体を培養し、該培養物から耐熱性ピログルタミルペプチダーゼを採取することを特徴とする耐熱性ピログルタミルペプチダーゼの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、タンパク質工学の分野で有用な新規な耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ、及び該酵素をコードする遺伝子、及び該酵素の遺伝子工学的製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】タンパク質やペプチドにはN末端がL-ピログルタミン酸残基で保護されているものが多数存在している。また、タンパク質やペプチドが加水分解された際に、新しく生じたアミノ末端のグルタミン又はグルタミン酸が非酵素的に閉環してピログルタミン酸残基が形成されることが多い。これらの、N末端がL-ピログルタミン酸残基で保護されているタンパク質やペプチドにはそのままではエドマン法によるアミノ酸配列決定法を用いることができず、該L-ピログルタミン酸残基を除去する操作が必要である。ピログルタミルペプチダーゼは、これらのタンパク質やペプチドのアミノ末端のL-ピログルタミン酸残基を特異的に遊離する酵素であり、タンパク質工学の分野で非常に有用な酵素である。ピログルタミルペプチダーゼは、種々の動物の脳、肺、血清や脳下垂体及び植物、微生物にも広く存在していることが知られている。例えばブタ肝臓由来の酵素〔ジャーナル オブ バイオケミストリー (J. Biochem.)、第101巻、第217~223頁(1987)、同、第106巻、第383~388頁(1987)〕、仔牛肝臓由来の酵素〔バイオケミカルアンド バイオフィジカ

ル リサーチ コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Comm.)、第81巻、第176~185頁(1978)〕又はバチルスアミロリクエファシエンス (Bacillus amyloliquefaciens) 由来の酵素〔ジャーナル オブ バイオケミストリー、第84巻、第467~476頁(1978)〕等が知られており、このうちバチルスアミロリクエファシエンス由来の酵素については遺伝子が単離され、遺伝子工学的な製造方法が報告されている(特開平5-137582号)。一方、タンパク質工学のプロセスに利用されるプロテアーゼには、高い熱安定性が要求されている。上述の酵素のうち、ブタ肝臓由来の酵素及び仔牛肝臓由来の酵素の至適温度は50℃付近である。またバチルスアミロリクエファシエンス由来の酵素の至適温度は50℃付近にあり、該酵素は60℃、30分の加熱でほぼ90%失活するため、これらの酵素を60℃以上の高温で使用することは困難であり、より耐熱性の高いピログルタミルペプチダーゼの開発が望まれている。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】近年、ピロコッカス フリオサス (Pyrococcus furiosus) に代表される好熱菌は、極めて高い耐熱性を持った酵素の供給源として期待されるが、これらの好熱菌よりピログルタミルペプチダーゼは得られていない。また、これらの菌体から酵素を取得するには、高温での微生物の培養が必要であり、工業的な製造方法としては遺伝子工学的な製造方法が望ましい。本発明はこれらの課題を解決するために、新規な耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ及び該酵素をコードする遺伝子及び該遺伝子を用いる耐熱性ピログルタミルペプチダーゼの製造方法を提供するものである。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、60℃で60分間処理したとき約95%以上の残存活性を保持していることを特徴とする耐熱性ピログルタミルペプチダーゼに関する。本発明の第2の発明は、第1の発明の耐熱性ピログルタミルペプチダーゼをコードする単離された遺伝子に関し、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列、又はその一部であって、かつ耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ酵素活性を有するDNA配列及び配列表の配列番号2で示されることを特徴とし、またこの遺伝子にハイブリダイズ可能である耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ遺伝子に関する。本発明の第3の発明は、工業的な製造方法に関し、第2の発明の遺伝子を含む組換えプラスミドを導入させた組換え体を培養し、該培養物から耐熱性ピログルタミルペプチダーゼを採取することを特徴とする。

【0005】本発明者らは、耐熱性に優れたピログルタミルペプチダーゼを得るためにピロコッカス フリオサス DSM3638よりピログルタミルペプチダーゼを精製し、部分アミノ酸配列を決定し、その情報に基づい

て遺伝子をスクリーニングしようと試みたが、菌体よりのピログルタミルペプチダーゼの精製は困難であった。目的とする酵素の一次構造に関する情報なしに酵素遺伝子をクローニングする方法としては例えば発現クローニング法があり、例えば、ピロコッカス ボウゼイ (*Pyrococcus woesei*) 由来のプルナーゼ遺伝子 (国際公開 92/02614号) はこの方法により取得された。一般に発現クローニング法にはプラスミドベクターが使用されるが、この場合には目的遺伝子が途中で切断されることなく、かつプラスミドベクターに挿入可能な程度の比較的小さな DNA 断片に切断されるような制限酵素を用いなければならず、必ずしもすべての酵素遺伝子のクローニングに適用可能ではない。更に、数多くのクローンについて酵素活性の発現を調べなければならず、操作が繁雑である。本発明者らは、プラスミドベクターに代えてより大きな DNA 断片 (35~50 kb) を保持できるコスミドベクターを用いてピロコッカス フリオサスゲノムより作製したコスミドライブラリーを構築し、該ライブラリー中にピログルタミルペプチダーゼ活性を発現するコスミドクローンを検索することにより、ピログルタミルペプチダーゼ遺伝子を単離することを試みた。コスミドベクターを用いることにより、酵素遺伝子内部が切断される恐れが減ると共に、スクリーニングする形質転換体の数を減らすことができる。その半面、コスミドベクターはプラスミドベクターほど宿主内でのコピー数が高くないため、酵素の発現量が低く、活性を検出できない可能性がある。本発明者らは、目的とする酵素が高い耐熱性を有する点に着目し、コスミドライブラリー中の形質転換体を個別に培養し、得られた菌体から耐熱性のタンパクのみを含むライゼートを調製する工程を組合せた。この一群のライゼートは、コスミドプロテインライブラリーと命名され、該コスミドプロテインライブラリーを酵素活性の検出に用いることにより、形質転換体のコロニーを用いる方法よりも検出感度が上がると共に、宿主由来のタンパク等によりバックグラウンドや酵素活性の阻害といった悪影響を除去することができる。

【0006】本発明者らは、ピロコッカス フリオサス由来のコスミドプロテインライブラリーを検索し、ピログルタミルペプチダーゼ活性を示す数個のコスミドクローンを取得した。本発明者らは、このクローン中に含まれる耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ遺伝子を含有する遺伝子断片の塩基配列を決定し、耐熱性ピログルタミルペプチダーゼをコードする領域を決定し、微生物において耐熱性ピログルタミルペプチダーゼを大量に発現する組換えプラスミドの構築を行った。本発明者らは該プラスミドにより形質転換した微生物を用いて新規な耐熱性ピログルタミルペプチダーゼを生産させることに成功し、該酵素の種々の酵素学的性質を明らかにした。更に、本発明者らはピロコッカス フリオサスの菌体を培養し、培養物より耐熱性ピログルタミルペプチダーゼを

採取できることを見出して本発明を完成した。

【0007】なお、このコスミドプロテインライブラリーを利用した発現クローニング法は、必ずしもあらゆる耐熱性酵素に応用できるわけではなく、目的とする遺伝子によりその成否は左右される。例えば本発明者らは該方法を用いてピロコッカス フリオサス由来のプロテアーゼ [アブライド アンド エンバイロンメンタルマイクロバイオロジー (Appl. Environment. Microbiol.)、第 56 巻、第 1992~1998 頁 (1990)] についても該プロテアーゼをコードする遺伝子の単離を試みたが該遺伝子の単離には至っていない。

【0008】本発明に係る耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ遺伝子は、好熱菌の遺伝子ライブラリーのスクリーニングにより得ることができる。好熱菌としてはピロコッカス属に属する細菌が使用でき、例えばピロコッカス フリオサスのゲノムのコスミドライブラリーより目的の遺伝子をスクリーニングし、得ることができる。ピロコッカス フリオサスとしてはピロコッカス フリオサス DSM3638 が使用でき、該菌株は、ドイッチェ ザムルンク フォン ミクロオルガニスムエン ウント ツェルクルチュウレン GmbH (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen und GmbH) より入手可能な菌株である。

【0009】ピロコッカス フリオサス ゲノムのコスミドライブラリーは、ピロコッカス フリオサスゲノム DNA を制限酵素 Sau3A I (宝酒造社製) で部分消化して得られた DNA 断片とトリプルヘリックスコスミドベクター (ストラタジーン社製) とをライゲーションした後、インビトロパッケージング法によってラムダファージ粒子中にパッケージングし、適当な微生物、例えば大腸菌 DH5MCR (BRL 社製) を形質転換することによって得ることができる。次にライブラリー中の形質転換体を培養した後、熱処理 (100℃、10 分間)、超音波処理、再熱処理 (100℃、10 分間) してコスミドプロテインライブラリーとして、得られたライゼート中のピログルタミルペプチダーゼ活性の有無を合成基質ピログルタミルパラニトロアニリド (Py-r-pN A) を基質としてスクリーニングすることができる。これにより、上記の熱処理に耐性のピログルタミルペプチダーゼを発現する、耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ遺伝子を含有するコスミドクローンをいくつか得ることができる。更に、このようにして得られたコスミドクローンの 1 つから調製したコスミドを BamHI (宝酒造社製) 消化し、得られた DNA 断片をプラスミドベクター pUC118 (宝酒造社製) の BamHI サイトに導入した組換えプラスミドを作製し、該プラスミドを導入した大腸菌 JM109 (宝酒造社製) を培養した後、ライゼート中の耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ活性を測定することにより、発現したピログルタミルペプチダーゼ遺伝子を含有する組換えプラスミドを得ることができる。

該プラスミドはプラスミド pPGP1 と命名されている。図 1 にプラスミド pPGP1 の制限酵素地図を示す。

【0010】更に pPGP1 について数種類の制限酵素を用いて種々の長さの DNA 断片を調製し、各断片を適当なプラスミドベクターに挿入した組換えプラスミドを作製することができる。次に、該プラスミドを用いて大腸菌 JM109 を形質転換し、これらの形質転換体について耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ活性を測定することにより、pPGP1 より耐熱性ピログルタミルペプチダーゼをコードしない遺伝子の部分を除いた組換えプラスミドを得ることができる。すなわち、前記のプラスミド pPGP1 を XbaI (宝酒造社製) 消化して得られる約 2 kb の DNA 断片を、pUC118 の XbaI サイトに導入して作製したプラスミドはプラスミド pPGP2 と命名され、これを導入された大腸菌 JM109 を培養して得られる培養物のライゼートは耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ活性を示す。図 2 にプラスミド pPGP2 の制限酵素地図を示す。更に、該プラスミド pPGP2 を HincII で消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、約 4.2 kb の DNA 断片をアガロースゲルより回収する。この DNA 断片を pUC118 にライゲーションして得られた組換えプラスミドを大腸菌 JM109 に導入し、出現したコロニーについてピログルタミルペプチダーゼ活性を測定し、活性が認められたコロニーよりプラスミドを調製することができ、該プラスミドは、pPGP3 と命名されている。図 3 にその制限酵素地図を示す。

【0011】更に、プラスミド pPGP3 から耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ遺伝子を含まない約 1 kb の DNA 断片を次のように除くことができる。すなわち、pPGP3 を XhoI (宝酒造社製) 及び SacI (宝酒造社製) 消化して得られる約 1 kb の XhoI-SacI 断片をプラスミドベクター pUC118 の SalI-SacI サイトに導入した後、大腸菌 JM109 に導入した。得られたコロニーの耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ活性を測定し、活性を示したコロニーよりプラスミドを調製する。該プラスミドはプラスミド pPGP6 と命名されている。図 4 にその制限酵素地図を示す。プラスミド pPGP6 で形質転換された大腸菌 JM109 は Escherichia coli JM109/pPGP6 と命名、表示され、工業技術院生命工学工業技術研究所に FERM P-13894 として寄託されている。プラスミド pPGP6 に挿入されている約 0.7 kbp の DNA 断片の塩基配列を配列表の配列番号 3 に示す。

【0012】耐熱性ピログルタミルペプチダーゼを大量に発現するためのプラスミドをプラスミド pPGP6 から次のように構築することができる。すなわち、配列表の配列番号 4 に示すオリゴヌクレオチド pPGP6-P

TV とし、プラスミド pPGP6 を鋳型として PCR を行うことにより、耐熱性ピログルタミルペプチダーゼの N 末端をコードすると考えられる領域の直前に制限酵素 DraI の認識配列を導入した、これらのプライマーの配列を両端にもつ DNA 断片を増幅することができる。増幅された約 700 bp の DNA 断片を DraI 及び XhoI で消化し、プラスミドベクター pTV118N (宝酒造社製) の NcoI-SalI サイトに挿入して、大腸菌 JM109 に導入して、得られたコロニーの耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ活性を測定し、活性を示したコロニーよりプラスミドを調製する。該プラスミドはプラスミド pPGP7 と命名されている。図 5 にその制限酵素地図を示す。プラスミド pPGP7 で形質転換された大腸菌 JM109 は Escherichia coli JM109/pPGP7 と命名されている。プラスミド pPGP7 に挿入されている約 0.6 kbp の DNA 断片の塩基配列の一部を配列表の配列番号 2 に示す。すなわち配列表の配列番号 2 は本発明によって得られる耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ遺伝子の 1 例の塩基配列である。該配列中、塩基番号 1 番～614 番がピロコッカスフリオサス由来の配列であり、615～639 番がプラスミド pTV118N 由来の配列である。また配列表の配列番号 1 に、配列番号 2 に示される塩基配列のうち塩基番号 1～612 番の部分より推定される遺伝子産物のアミノ酸配列を示す。すなわち配列表の配列番号 1 は本発明によって得られる耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ遺伝子を用いて生産される酵素タンパクの 1 例のアミノ酸配列である。

【0013】また、pPGP7 に比較してより長い部分の耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ遺伝子を含む発現用プラスミドを構築することができる。すなわち、上述の pPGP6-P TV 及び M13 プライマー M4 をプライマーとし、プラスミド pPGP3 を鋳型として PCR を行うことによりこれらのプライマーの配列を両端に有する約 1 kbp の DNA 断片を増幅する。該断片を DraI 及び HincII で消化し、プラスミドベクター pTV118N の NcoI-HincII サイトに挿入し、大腸菌 JM109 に導入して、得られたコロニーの耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ活性を測定し、活性を示したコロニーよりプラスミドを調製する。該プラスミドはプラスミド pPGP8 と命名されている。図 6 にその制限酵素地図を示す。プラスミド pPGP8 で形質転換された大腸菌 JM109 は Escherichia coli JM109/pPGP8 と命名されている。更に上記プラスミド pPGP8 を ApaI 及び HincII で消化して切り出される約 0.3 kbp の DNA 断片を取り除いて得られたプラスミドは pPGP9 と命名されている。プラスミド pPGP9 の制限酵素地図を図 7 に示す。プラスミド pPGP9 で形質転換された大腸菌 JM109 は Escherichia coli JM109/pPGP9 と命名、表示され、工業技術院生命工学工業技術研究所に FERM P-14207 として寄託され

ている。プラスミド pPGP9 に挿入されている約 670bp の DNA 断片の塩基配列を配列表の配列番号 5 に示す。すなわち配列表の配列番号 5 は本発明によって得られる耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ遺伝子の 1 例の塩基配列である。また配列表の配列番号 6 に、配列番号 5 に示される塩基配列の塩基番号 1~624 番までの部分より推定される遺伝子産物のアミノ酸配列を示す。すなわち配列表の配列番号 6 は本発明によって得られる耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ遺伝子を用いて生産される酵素タンパクの 1 例のアミノ酸配列の一部である。

【0014】 *Escherichia coli* JM109/pPGP7 又は *Escherichia coli* JM109/pPGP9 を通常の培養条件、例えば 100  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含む 2  $\times$  TY 培地（トリプトン 16 g/リットル、酵母エキス 10 g/リットル、NaCl 5 g/リットル、pH 7.2）中、37℃ で培養することにより、培養菌体中に耐熱性ピログルタミルペプチダーゼを発現させることができる。培養終了後、培養菌体を集菌し、得られた菌体の超音波処理後の遠心上清を粗酵素液とし、該酵素液の 100℃、10 分間の熱処理による夾雑タンパク質の変性処理、除核酸処理、硫酸塩析処理、透析処理、疎水性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等の通常酵素の精製に用いられる方法を組合せて用いることによって耐熱性ピログルタミルペプチダーゼを精製することができる。

【0015】 *Escherichia coli* JM109/pPGP7 を培養終了後、培養菌体を集菌し、得られた菌体の超音波処理後の遠心上清を粗酵素液とし、該酵素液の 100℃、5 分間の熱処理による夾雑タンパク質の変性処理後の遠心処理を行って、遠心上清を耐熱性ピログルタミルペプチダーゼの酵素標品（1）として酵素化学的、及び理化学的性質を測定した。また *Escherichia coli* JM109/pPGP9 について同様に酵素標品を調製し、酵素標品（2）として酵素化学的、及び理化学的性質を測定した。

【0016】 本発明の耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ遺伝子を発現することにより得られる耐熱性ピログルタミルペプチダーゼは、ピロコッカス属に属する菌株、例えばピロコッカス フリオサス DSM3638 やピロコッカス ボウゼイ DSM3773 を適当な増殖培地中で培養し、その菌体及び培養液より精製して得ることもできる。ピロコッカス属の菌体の培養に当っては、通常、好熱菌の培養に用いられる方法が利用でき、培地に加える栄養源は使用する菌株が利用し得るものであればよい。炭素源としては、例えばデンプン等が利用でき、窒素源としては、例えばトリプトン、ペプトン等が利用でき、他の栄養源としては、例えば、酵母エキス等が利用できる。培地中には、マグネシウム塩、ナトリウム塩、鉄塩などの金属塩を微量元素として加えてもよい。また例えば、培地の調製に人工海水を用いることが有利である。また培地は固形の硫黄を含んでいない透明な培地が望ましく、該培地を用いれば、菌体の増殖は光

学密度を測定することにより容易に監視することができる。培養に当っては、静置培養又はかくはん培養で行うことができるが、例えば特表平 4-503757 号公報に記載のごとく、通気培養を行ってもよいし、例えばアブライド アンド エンバイロンメンタル マイクロバイオロジー、第 55 巻、第 2086~2088 頁（1992）に記載のように、透析培養法を用いてもよい。一般に培養温度は、95℃前後が好ましく、通常 16 時間程度で耐熱性ピログルタミルペプチダーゼが培養物中に著量蓄積する。培養条件は、使用する菌体、培地組成に応じ耐熱性ピログルタミルペプチダーゼの生産量が最大になるように設定するのは当然である。

【0017】 耐熱性ピログルタミルペプチダーゼを採取するに当っては、例えば培養液から遠心分離、ろ過などによって菌体を集め、次いで菌体を破碎すればよく、菌体の破碎方法としては、超音波破碎、ビーズ破碎、溶菌酵素処理等があり、これらの方法を利用して菌体中より耐熱性ピログルタミルペプチダーゼを抽出することができる。なお、酵素の抽出は使用する菌体によって最も抽出効果の高い方法を採用して粗酵素液を調製すればよい。かくして得られた粗酵素液から耐熱性ピログルタミルペプチダーゼを単離するに当っては、通常の酵素の精製に用いられる方法を使用できる。例えば、硫酸塩析処理、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等の方法を組合せて使用できる。

【0018】 本発明者らはピロコッカス フリオサス DSM3638 を培養し、該培養物中に耐熱性ピログルタミルペプチダーゼが存在することを確認した。すなわち、トリプトン 1%、酵母エキス 0.5%、可溶性デンプン 1%、ジャマリン S・ソリッド（ジャマリンラボラトリー）3.5%、ジャマリン S・リキッド（ジャマリンラボラトリー）0.5%、MgSO<sub>4</sub> 0.003%、NaCl の 0.001%、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.0001%、CoSO<sub>4</sub> 0.0001%、CaCl<sub>2</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.0001%、ZnSO<sub>4</sub> 0.0001%、CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.1ppm、KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0.1ppm、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.1ppm、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.1ppm、NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.25ppm の組成が培地 2 リットルを 2 リットル容のメディウムボトルに入れ、120℃、20 分間殺菌した後、窒素ガスを吹込み溶存酸素を除去した後、これに上記菌株を接種して 95℃、16 時間静置培養した。培養後、遠心分離によって菌体を集めた。集菌体を 50mM トリス-HCl 緩衝液（pH 7.8）に懸濁し、超音波処理により菌体を破碎した。該菌体破碎液を遠心分離し得られた上清を酵素標品（3）として耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ活性の酵素化学的、及び理化学的性質を測定した。酵素標品（1）、（2）及び（3）の酵素化学的及び理化学的性質を以下に示す。

## 【0019】(1) 作用

Ｌーピログルタミン酸-ｐ-ニトロアニリド (Pyrr-pNA) を加水分解し、黄色物質 (ｐ-ニトロアニリン) を生成する。また、Ｌーピログルタミン酸-７-アミド-４-メチルクマリリン (Pyrr-MCA) を加水分解し、蛍光発色物質 ７-アミノ-４-メチルクマリリン (AMC) を生成する。更に、ニューロテンシン又はフィサラミンを加水分解し、N末端由来の遊離のピログルタミン酸を生成する。

## 【0020】(2) 酵素活性測定方法

上述した酵素標品 (1)、(2) 及び (3) の性質検討においては、適度に希釈した酵素標品の試料溶液 5  $\mu$ l に 1mM の Pyrr-pNA、10mM の DTT を含む 50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 500  $\mu$ l を加え、75℃で15分間反応させた。氷冷して終濃度 5% となるように 30% 酢酸を加えて反応を停止し、410nm における吸光度を測定し、ｐ-ニトロアニリンの生成量を求めた。酵素 1 単位は 75℃において 1 分間に 1  $\mu$  mole の ｐ-ニトロアニリンを生成する酵素量とした。酵素標品 (1)、(2) 及び (3) は測定された pH 7.0、75℃において Pyrr-pNA 分解活性を有していた。コスミドプロテインライブラリーのスクリーニングにおいては、酵素活性を測定しようとする溶液を適度に希釈し、その試料溶液に 20  $\mu$ l に 1mM の Pyrr-pNA を含む 50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) 100  $\mu$ l を加え、95℃で30分間反応させた。氷冷して反応を停止した後、410nm における吸光度を測定し、ｐ-ニトロアニリンの生成量を求めた。Pyrr-MCA (ペプチド研究所社製) を基質としてその分解活性を測定した。すなわち 1 ミリ単位の酵素を含む試料溶液 20  $\mu$ l に 1mM の Pyrr-MCA を含む 50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) 100  $\mu$ l を加えて、95℃で30分間反応させた。氷冷して反応を停止した後、励起波長 380nm、測定波長 460nm における蛍光強度を測定し、AMC の生成量を求めた。酵素 1 単位は 95℃において 1 分間に 1  $\mu$  mole の AMC を生成する酵素量とした。酵素標品 (1)、(2) 及び (3) は測定された pH 7.5、95℃において Pyrr-MCA 分解活性を有していた。ニューロテンシン、又はフィサラミン (ペプチド研究所社製) を基質として耐熱性ピログルタミルペプチダーゼによる分解活性を測定した。すなわち 100 pmole のニューロテンシン又はフィサラミンを含む 50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 197.5  $\mu$ l に酵素を含む試料溶液 2.5  $\mu$ l を加え、95℃で5時間反応させた。氷冷して反応を停止した後、反応液の一部をアミノ酸分析に供し、遊離したアミノ酸を分析した。酵素標品 (1)、(2) 及び (3) は測定された pH 7.0、95℃においてニューロテンシン又はフィサラミンの N 末端のピログルタミン酸を遊離する活性を有していた。

## 【0021】(3) 至適温度

測定には 3 ミリ単位の酵素標品を用い、種々の温度で反応を行った。酵素標品 (1)、(2) 及び (3) は図 8 に示すように測定された pH 7.0 において、37℃～104℃の範囲で活性があり、その至適温度は 85℃～95℃であった。図 8 は酵素標品 (1)、(2) 及び (3) の至適温度を示す図であり、縦軸は相対活性率 (%)、横軸は反応温度 (℃) を示す。図中白丸印は酵素標品 (1)、黒丸印は酵素標品 (2)、+印は酵素標品 (3) の各結果を示す。

## 【0022】(4) 至適 pH

測定には 3 ミリ単位の酵素標品を用い、活性測定に用いる基質溶液を pH 4.0～6.0 においては 50mM クエン酸ナトリウム緩衝液、pH 4.0～5.0 においては 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0～8.0 においては 50mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 8.0～9.6 においては 50mM ホウ酸ナトリウム緩衝液、また pH 10.2～10.9 においては 50mM リン酸水素二ナトリウム-水酸化ナトリウム緩衝液を用いて調製し使用した。酵素標品 (1)、(2) 及び (3) は図 9 で示すように、pH 7.0 付近で最大活性を示した。図 9 は酵素標品 (1)、(2) 及び (3) の至適 pH を示す図であり、縦軸は相対活性率 (%)、横軸は pH を示す。図中白丸印は酵素標品 (1)、黒丸印は酵素標品 (2)、+印は酵素標品 (3) の各結果を示す。

## 【0023】(5) 温度安定性

1.5 単位の酵素を含む 10mM DTT、50mM リン酸ナトリウム pH 7.0 溶液を 60℃及び 75℃で種々の時間処理をした後その一部を用いて残存する酵素活性を測定した。図 10 に示すように酵素標品 (1)、(2)、(3) は 60℃、30 分間の処理後では 95% 以上の活性を保持しており、75℃、150 分間の処理後も、ほぼ 90% の活性を保持していた。図 10 は本発明により得られる酵素標品 (1)、(2)、(3) の温度安定性を示す図であり、縦軸は残存活性率 (%)、横軸は熱処理時間 (分) を示す。図中白丸印は酵素標品 (1)、黒丸印は酵素標品 (2)、+印は酵素標品 (3) の各測定結果であり、破線は 60℃、実線は 75℃での結果を示す。

## 【0024】(6) pH 安定性

0.75 単位の酵素を含む 10mM DTT、50mM の各 pH の緩衝液を 75℃で 30 分間処理した後、その一部を用いて残存する酵素活性を測定した。緩衝液として、pH 4.0～6.0 においてはクエン酸ナトリウム、pH 4.0～5.0 においては酢酸ナトリウム、pH 6.0～8.0 においてはリン酸ナトリウム、pH 8.0～9.6 においてはホウ酸ナトリウム、pH 10.2～10.9 においてはリン酸水素二ナトリウム-水酸化ナトリウムをそれぞれ用いた。図 11 に示すように、酵素標品 (1)、(2)、(3) は pH 5.0～8.8 の間で

は75℃30分間の処理後も80%以上の活性を保持していた。図11は本発明により得られた酵素標品

(1)、(2)、(3)のpH安定性を示す図であり、縦軸は残存活性率(%)、横軸はpHを示す。図中、白丸印は酵素標品(1)、黒丸印は酵素標品(2)、+印は酵素標品(3)の各測定結果を示す。

【0025】以上、詳細に説明したように、本発明により耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ及び該酵素をコードする遺伝子が提供され、該遺伝子を用いた耐熱性ピログルタミルペプチダーゼの工業的製造方法が提供される。本発明により得られる耐熱性ピログルタミルペプチダーゼは高度の耐熱性を有する新規酵素であり、高温下でのタンパク質工学的な処理において特に有用である。また、本発明により単離された遺伝子を用いることにより、該遺伝子にハイブリダイズ可能な耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ遺伝子を簡便にクローニングすることができる。また本発明により得られる耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ遺伝子に適切な修飾を施すことにより、該ピログルタミルペプチダーゼの機能を更に改善することができる。

【0026】

【実施例】以下に本発明の実施例を示すが、本発明が以下の実施例の範囲のみに限定されるものではない。なお、実施例中の%は重量%を意味する。

【0027】実施例1

(ピロコッカス フリオサス ゲノムDNAの調製)ピロコッカス フリオサス DSM3638の培養は以下のとおりに行った。トリプトン1%、酵母エキス0.5%、可溶性デンプン1%、ジャマリンS・ソリッド(ジャマリンラボラトリー)3.5%、ジャマリンS・リキッド(ジャマリンラボラトリー)0.5%、MgSO<sub>4</sub> 0.003%、NaClの0.001%、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.0001%、CoSO<sub>4</sub> 0.0001%、CaCl<sub>2</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.0001%、ZnSO<sub>4</sub> 0.0001%、CuSO<sub>4</sub>・5H<sub>2</sub>O 0.1ppm、KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0.1ppm、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.1ppm、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>・2H<sub>2</sub>O 0.1ppm、NiCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O 0.25ppmの組成が培地2リットルを2リットル容のメディウムボトルに入れ、120℃、20分間殺菌した後、窒素ガスを吹込み溶存酸素を除去した後、これに上記菌株を接種して95℃、16時間静置培養した。培養後、遠心分離によって菌体を集めた。次に集菌体を25%スクロースを含む0.05Mトリス-HCl(pH8.0)4mlに懸濁し、この懸濁液に0.8mlのリゾチム[5mg/ml、0.25Mトリス-HCl(pH8.0)]、2mlの0.2M EDTAを加えて、20℃で1時間保温した後、24mlのSET溶液[150mM NaCl、1mM EDTA、20mMトリス-HCl(pH8.0)]を加え、更に5%SDS 4ml、プロテイナーゼK(10mg/ml)400μlを加

え、37℃、1時間反応させた。反応終了後、フェノールクロホルム抽出、続いてエタノール沈殿を行い、約3.2mgのゲノムDNAを調製した。

【0028】(コスミドプロテインライブラリーの作製)ピロコッカス フリオサス ゲノムDNA400μgをSau3AIで部分消化し、密度勾配超遠心法により、35~50kbにサイズ分画した。次に、トリプルヘリックスコスミドベクター1μgをBamHI消化し、上記分画された35~50kbのDNA140μgと混合したライゲーションを行い、ガイガーバックゴールド(ストラタジーン社製)を用いたインビトロパッケージング法によってピロコッカス フリオサス ゲノムDNAのフラグメントをラムダファージ粒子中にパッケージングした。得られたファージ溶液の一部を用いて大腸菌DH5αMCRを形質転換し、ライブラリーを調製した。得られたコロニーのうち数個を選んでコスミドを調製し、適当な大きさの挿入断片があることを確認したのち、調製した500個のコロニーから個別に形質転換体を100μg/mlのアンピシリンを含む150mlのLB培地(トリプトン10g/リットル、酵母エキス5g/リットル、NaClの5g/リットル、pH7.2)中で培養した。該培養物を遠心し、回収した菌体を20mMトリス-HCl、pH8.0 1mlに懸濁し、100℃で10分間熱処理した。続いて超音波処理を行い、更にもう一度100℃、10分間熱処理した。遠心後の上清として得られるライゼートをコスミドプロテインライブラリーとした。

【0029】(耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ遺伝子を含むコスミドの選択)上記のコスミドプロテインライブラリーからライゼート20μlずつをとり、前述した酵素活性測定方法に従って95℃でのPyr-pNA分解活性及びPyr-MCA分解活性、ニューロテンシン及びフィサミンに対する分解活性を測定し、ピログルタミルペプチダーゼ活性を持つ2つのコスミドクローンを得た。

【0030】(プラスミドpPGP1の調製)ピログルタミルペプチダーゼ活性を持つ2つのコスミドクローンの一方についてコスミドを調製し、BamHI消化した後、プラスミドベクターpUC118のBamHIサイトにライゲーションした。この組換えプラスミドを大腸菌JM109に導入した後、100μg/mlのアンピシリンを含むLBプレート上にまき、出現したコロニーについて100μg/mlのアンピシリンを含む5mlのLB培地中で培養を行った。該培養物を遠心して回収した菌体を50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)50μlに懸濁し、100℃、10分間熱処理を行った後、超音波処理によって菌体を破碎した。更にもう一度、100℃、10分間の熱処理を行い、遠心してライゼートを得た。このライゼートについてピログルタミルペプチダーゼ活性を測定した。すなわち20μlのライゼートに1



mMのPy-r-pNAを有する50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)100μlを加え、95℃で30分間反応させた。氷冷して反応を停止した後、410nmにおける吸光度を測定しp-ニトロアニリンの生成量を求めた。ピログルタミルペプチダーゼ活性を有するコロニーよりプラスミドを調製し、これをプラスミドpPGP1と命名した。

【0031】(プラスミドpPGP2の調製)上記プラスミドpPGP1についてXbaIの切断位置を調べ、図1に示す制限酵素地図を得た。この制限酵素地図を基に約2kbのXbaI断片をプラスミドベクターpUC118にXbaIサイトを利用して挿入した。この組換えプラスミドを大腸菌JM109に導入し、出現したコロニーについて上述の方法でピログルタミルペプチダーゼ活性を調べた。耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ活性が認められたコロニーよりプラスミドを調製し、これをプラスミドpPGP2と命名した。図2にプラスミドpPGP2の制限酵素地図を示す。

【0032】(プラスミドpPGP3の調製)上記プラスミドpPGP2をHincII消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、約4.3kbのDNA断片をアガロースゲルより回収した。このDNA断片をライゲーションして得られた組換えプラスミドを大腸菌JM109に導入し、出現したコロニーについて前述の方法でピログルタミルペプチダーゼ活性を調べた。耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ活性が認められたコロニーよりプラスミドを調製し、これをプラスミドpPGP3と命名した。図3にプラスミドpPGP3の制限酵素地図を示す。

【0033】(プラスミドpPGP6の調製)上記プラスミドpPGP3をXhoI、SacI消化して得られた約0.7kbのXhoI-SacI断片をプラスミドベクターpUC118にSalI-SacIサイトを利用して導入した。この組換えプラスミドを大腸菌JM109に導入した。出現したコロニーについて前述の方法でピログルタミルペプチダーゼ活性を調べた。耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ活性が認められたコロニーよりプラスミドを調製し、これをプラスミドpPGP6と命名した。図4にプラスミドpPGP6の制限酵素地図を示す。プラスミドpPGP6で形質転換された大腸菌JM109はEscherichia coli JM109/pPGP6と命名、表示され、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-13894として寄託されている。上記プラスミドpPGP6に挿入された耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ遺伝子を含む約0.7kbのDNA断片を種々の制限酵素で適当なサイズに断片化し、該断片をプラスミドベクターpUC118にサブクローニングした後、各断片の塩基配列を決定した。塩基配列の決定はBcaBestジデオキシシーケンシングキット(宝酒造社製)を用いたジデオキシ法により行った。該DNA断片の塩基配列の一部を配列表の配列番号3に示す。

【0034】(耐熱性ピログルタミルペプチダーゼを大量発現するプラスミドpPGP7の調製)上記のDNA配列の情報に基づいて、大腸菌内で耐熱性ピログルタミルペプチダーゼを直接に大量発現する組換えプラスミドをPCRを利用した部位特異的変異導入法により構築した。耐熱性ピログルタミルペプチダーゼのN末端をコードすると考えられる領域の直前に制限酵素DraIの認識配列を導入できるように設計した、配列表の配列番号4に示すオリゴヌクレオチドpPGP6-pTVを合成した。このオリゴヌクレオチドとM13プライマーM4(宝酒造社製)をプライマー、プラスミドPGP6を鋳型としてPCRを行い、これらのプライマーの配列を両端にもつ約700bpの2本鎖DNAを合成した後、これをDraI、XhoIで消化した。一方、プラスミドベクターpTV118NをNcoI消化し、ランディングキット(宝酒造社製)を用いて末端を平滑化した後にSalI消化し、これと前述の制限酵素消化したPCR産物をライゲーションした後、大腸菌JM109に導入した。得られたコロニーについて、前述の方法でピログルタミルペプチダーゼ活性を調べ、活性が認められたコロニーよりプラスミドを調製し、これをプラスミドpPGP7と命名した。プラスミドpPGP7で形質転換された大腸菌JM109をEscherichia coli JM109/pPGP7と命名した。プラスミドpPGP7に挿入されている約640bpのDNA断片の塩基配列を前述の方法に基づいて決定した。該配列を配列表の配列番号2に示す。また、配列番号2の塩基配列1~612番の部分から推定されるアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

【0035】(プラスミドpPGP8の構築)上述したプライマーpPGP6-pTVとM13プライマーM4をプライマーとし、プラスミドpPGP3を鋳型としたPCRを行い、これらのプライマーの配列を両端にもつ約1kbの2本鎖DNAを合成した後、これをDraI、HincIIで消化した。一方、プラスミドベクターpTV118NをNcoI消化し、末端を平滑化した後、更にHincII消化し、これと前述の制限酵素消化したPCR産物とをライゲーションした後、大腸菌JM109に導入した。得られたコロニーについて前述の方法でピログルタミルペプチダーゼ活性を調べ、活性が認められたコロニーよりプラスミドを調製し、これをプラスミドpPGP8と命名した。図6にプラスミドpPGP8の制限酵素地図を示す。

【0036】(プラスミドpPGP9の構築)上記プラスミドpPGP8をApaLI(宝酒造社製)消化したのちDNA末端を平滑化し、更にAccIII(宝酒造社製)消化後アガロースゲル電気泳動を行い、分離した約400bpのApaLI-AccIII断片をアガロースゲルより回収した。次に、プラスミドpPGP8をAccIII-HincII(宝酒造社製)消化後、前述の約400bpのDNA断片と混合してライゲーションを行い、大

腸菌 JM109 に導入した。得られたコロニーについて前述の方法でピログルタミルペプチダーゼ活性を調べ、活性が認められたコロニーよりプラスミドを調製し、これをプラスミド pPGP9 と命名した。図 7 にプラスミド pPGP9 の制限酵素地図を示す。プラスミド pPGP9 により形質転換された大腸菌 JM109 は *Escherichia coli* JM109/pPGP9 と命名、表示され、工業技術院生命工学工業技術研究所に FERM P-14207 として寄託されている。

【0037】プラスミド pPGP9 に挿入されている約 680bp の DNA 断片について、前述の方法に準じて DNA の塩基配列を決定した。該断片の DNA 塩基配列の一部を配列表の配列番号 5 に示す。配列番号 5 中、塩基番号 1 番～3 番が開始コドンであり、塩基番号 625 番～627 番が終止コドンである。塩基番号 1 番～627 番の部分の DNA 配列から推定されるアミノ酸配列を配列表の配列番号 6 に示す。

【0038】次に *Escherichia coli* JM109/pPGP7 又は *Escherichia coli* JM109/pPGP9 を  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  のアンピシリンを含む  $2\times\text{TY}$  培地（トリプトン  $16\text{g}/\text{リットル}$ 、酵母エキス  $10\text{g}/\text{リットル}$ 、 $\text{NaCl}$   $5\text{g}/\text{リットル}$ 、 $\text{pH}7.2$ ）中、 $37^\circ\text{C}$  で培養し、培養終了後、培養菌体を集菌し、得られた菌体の超音波処理後の遠心上清を粗酵素液とし、該酵素液の  $100^\circ\text{C}$ 、5 分間の熱処理による夾雑タンパク質の変性処理後に遠心処理を行って、遠心上清を耐熱性ピログルタミルペプチダーゼの酵素標品（1）として酵素化学的、及び理化学的性質を測定した。また *Escherichia coli* JM109/pPGP9 について同様に酵素標品を調製し、酵素標品（2）として酵素化学的、及び理化学的性質を測定した。

【0039】更に、トリプトン 1%、酵母エキス 0.5%、可溶性デンプン 1%、ジャマリン S・ソリッド（ジャマリンラボラトリー）3.5%、ジャマリン S・リキッド（ジャマリンラボラトリー）0.5%、 $\text{MgSO}_4$  0.003%、 $\text{NaCl}$  の 0.001%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0001%、 $\text{CoSO}_4$  0.0001%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0001%、 $\text{ZnSO}_4$  0.0001%、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.1ppm、 $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$  0.1ppm、 $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.1ppm、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1ppm、 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.25ppm の組成の培地 2 リットルを 2 リットル容のメディウムボトルに入れ、 $120^\circ\text{C}$ 、20 分間殺菌した後、窒素ガスを吹込み溶存酸素を除去した後、ピロコッカス フリオサス DSM3638 を接種して  $95^\circ\text{C}$ 、16 時間静置培養した。培養後、遠心分離によって菌体を集めた。集菌体を 50mM トリス-HCl 緩衝液（ $\text{pH}7.8$ ）に懸濁し、超音波処理により菌体を破碎した。該菌体破碎液を遠心分離しその上清を酵素標品（3）として耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ活性の酵素化学的、及び理化学的性質を測定した。酵

素標品（1）、（2）及び（3）の酵素化学的及び理化学的性質の測定結果を以下に示す。

#### 【0040】（1）作用

Ｌーピログルタミン酸-p-ニトロアニリド（Pyrr-pNA）を加水分解し、黄色物質（p-ニトロアニリン）を生成した。また、Ｌーピログルタミン酸-７-アミド-４-メチルクマリン（Pyrr-MCA）を加水分解し、蛍光発色物質 ７-アミノ-４-メチルクマリン（AMC）を生成した。更に、ニューロテンシン又はフィサラミンを加水分解し、N 末端由来の遊離のピログルタミン酸を生成した。

#### 【0041】（2）酵素活性測定方法

上述した酵素標品（1）、（2）及び（3）の性質検出においては、適度に希釈した酵素標品の試料溶液  $5\mu\text{l}$  に 1mM の Pyrr-pNA、10mM の DTT を含む 50mM リン酸ナトリウム緩衝液（ $\text{pH}7.0$ ） $500\mu\text{l}$  を加え、 $75^\circ\text{C}$  で 15 分間反応させた。氷冷した終濃度 5% となるように 30% 酢酸を加えて反応を停止し、410nm における吸光度を測定し、p-ニトロアニリンの生成量を求めた。酵素 1 単位は  $75^\circ\text{C}$  において 1 分間に  $1\mu\text{mole}$  の p-ニトロアニリンを生成する酵素量とした。酵素標品（1）、（2）及び（3）は測定された  $\text{pH}7.0$ 、 $75^\circ\text{C}$  において Pyrr-pNA 分解活性を有していた。コスミドプロテインライブラリーのスクリーニングにおいては、酵素活性を測定しようとする溶液を適度に希釈し、その試料溶液  $20\mu\text{l}$  に 1mM の Pyrr-pNA を含む 50mM リン酸ナトリウム緩衝液（ $\text{pH}7.5$ ） $100\mu\text{l}$  を加え、 $95^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させた。氷冷して反応を停止した後、410nm における吸光度を測定し、p-ニトロアニリンの生成量を求めた。Pyrr-MCA（ペプチド研究所社製）を基質としてその分解活性を測定した。すなわち 1 ミリ単位の酵素を含む試料溶液  $20\mu\text{l}$  に 1mM の Pyrr-MCA を含む 50mM リン酸ナトリウム緩衝液（ $\text{pH}7.5$ ） $100\mu\text{l}$  を加えて、 $95^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させた。氷冷して反応を停止した後、励起波長 380nm、測定波長 460nm における蛍光強度を測定し、AMC の生成量を求めた。酵素 1 単位は  $95^\circ\text{C}$  において 1 分間に  $1\mu\text{mole}$  の AMC を生成する酵素量とした。酵素標品（1）、（2）及び（3）は測定された  $\text{pH}7.5$ 、 $95^\circ\text{C}$  において Pyrr-MCA 分解活性を有していた。ニューロテンシン、又はフィサラミン（ペプチド研究所社製）を基質として耐熱性ピログルタミルペプチダーゼによる分解活性を測定した。すなわち  $100\text{pmole}$  のニューロテンシン又はフィサラミンを含む 50mM リン酸ナトリウム緩衝液（ $\text{pH}7.0$ ） $197.5\mu\text{l}$  に酵素を含む試料溶液  $2.5\mu\text{l}$  を加え、 $95^\circ\text{C}$  で 5 時間反応させた。氷冷して反応を停止した後、反応液の一部をアミノ酸分析に供し、遊離したアミノ酸を分析した。酵素標品（1）、（2）及び（3）は測定された  $\text{pH}7.0$ 、 $95^\circ\text{C}$  においてニューロテンシン又

はフィサラミンのN末端のピログルタミン酸を遊離する活性を有していた。

#### 【0042】(3) 至適温度

測定には3ミリ単位の酵素標品を用い、種々の温度で反応を行った。酵素標品(1)、(2)及び(3)は図8に示すように測定されたpH7.0において、37℃～104℃の範囲で活性があり、その至適温度は85℃～95℃であった。図8は酵素標品(1)、(2)及び(3)の至適温度を示す図であり、縦軸は相対活性率(%)、横軸は反応温度(℃)を示す。図中白丸印は酵素標品(1)、黒丸印は酵素標品(2)、+印は酵素標品(3)の各結果を示す。

#### 【0043】(4) 至適pH

測定には3ミリ単位の酵素標品を用い、活性測定に用いる基質溶液をpH4.0～6.0においては50mMクエン酸ナトリウム緩衝液、pH4.0～5.0においては50mM酢酸ナトリウム緩衝液、pH6.0～8.0においては50mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH8.0～9.6においては50mMホウ酸ナトリウム緩衝液、またpH10.2～10.9においては50mMリン酸水素二ナトリウム-水酸化ナトリウム緩衝液を用いて調製し、使用した。酵素標品(1)、(2)及び(3)は図9で示すようにpH7.0付近で最大活性を示した。図9は酵素標品(1)、(2)及び(3)の至適pHを示す図であり、縦軸は相対活性率(%)、横軸はpHを示す。図中白丸印は酵素標品(1)、黒丸印は酵素標品(2)、+印は酵素標品(3)の各結果を示す。

#### 【0044】(5) 温度安定性

1.5単位の酵素を含む10mM DTT、50mMリン酸ナトリウム pH7.0溶液を60℃及び75℃で種々の時間処理をした後、その一部を用いて残存する酵素活性を測定した。図10に示すように酵素標品(1)、(2)、(3)は60℃、30分間の処理後では95%以上の活性を保持しており、75℃150分間の処理後も、ほぼ90%の活性を保持していた。図10は本発明により得られる酵素標品(1)、(2)、(3)の温度安定性を示す図であり、縦軸は残存活性率(%)、横軸

は熱処理時間(分)を示す。図中白丸印は酵素標品

(1)、黒丸印は酵素標品(2)、+印は酵素標品

(3)の各測定結果であり、破線は60℃、実線は75℃での結果を示す。

#### 【0045】(6) pH安定性

0.75単位の酵素を含む10mM DTT、50mMの各pHの緩衝液を75℃で30分間処理した後、その一部を用いて残存する酵素活性を測定した。緩衝液として、pH4.0～6.0においてはクエン酸ナトリウム、pH4.0～5.0においては酢酸ナトリウム、pH6.0～8.0においてはリン酸ナトリウム、pH8.0～9.6においてはホウ酸ナトリウム、pH10.2～10.9においてはリン酸水素二ナトリウム-水酸化ナトリウムをそれぞれ用いた。図11に示すように、酵素標品(1)、(2)、(3)はpH5.0～8.8の間では75℃30分間の処理後も80%以上の活性を保持していた。図11は本発明により得られる酵素標品

(1)、(2)、(3)のpH安定性を示す図であり、縦軸は残存活性率(%)、横軸はpHを示す。図中、白丸印は酵素標品(1)、黒丸印は酵素標品(2)、+印は酵素標品(3)の各測定結果を示す。

#### 【0046】

【発明の効果】本発明により、タンパク質工学の分野で有用な新規な耐熱性ピログルタミルペプチダーゼ、及び該酵素をコードする遺伝子が提供され、該遺伝子を用いることにより工業的に耐熱性ピログルタミルペプチダーゼを得ることができる。

#### 【0047】

##### 【配列表】

【0048】配列番号：1

配列の長さ：204

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源：生物名：ピロコッカス フリオサス(Pyrococcus furiosus)

配列：

Met	Lys	Val	Leu	Val	Thr	Gly	Phe	Glu	Pro	Phe	Gly	Gly	Glu	Lys
1				5					10					15
Ile	Asn	Pro	Thr	Glu	Arg	Ile	Ala	Lys	Asp	Leu	Asp	Gly	Ile	Lys
				20					25					30
Ile	Gly	Asp	Ala	Gln	Val	Phe	Gly	Arg	Val	Leu	Pro	Val	Val	Phe
				35					40					45
Gly	Lys	Ala	Lys	Glu	Val	Leu	Glu	Lys	Thr	Leu	Glu	Glu	Ile	Lys
				50					55					60
Pro	Asp	Ile	Ala	Ile	His	Val	Gly	Leu	Ala	Pro	Gly	Arg	Ser	Ala
				65					70					75
Ile	Ser	Ile	Glu	Arg	Ile	Ala	Val	Asn	Ala	Ile	Asp	Ala	Arg	Ile
				80					85					90

Pro Asp Asn Glu Gly Lys Lys Ile Glu Asp Glu Pro Ile Val Pro  
 95 100 105  
 Gly Ala Pro Thr Ala Tyr Phe Ser Thr Leu Pro Ile Lys Lys Ile  
 110 115 120  
 Met Lys Lys Leu His Glu Arg Gly Ile Pro Ala Tyr Ile Ser Asn  
 125 130 135  
 Ser Ala Gly Leu Tyr Leu Cys Asn Tyr Val Met Tyr Leu Ser Leu  
 140 145 150  
 His His Ser Ala Thr Lys Gly Tyr Pro Lys Met Ser Gly Phe Ile  
 155 160 165  
 His Val Pro Tyr Ile Pro Glu Gln Ile Ile Asp Lys Ile Gly Lys  
 170 175 180  
 Gly Gln Val Pro Pro Ser Met Cys Tyr Glu Met Glu Leu Glu Ala  
 185 190 195  
 Val Lys Val Ala Ile Glu Val Ala Leu  
 200

【0049】配列番号：2

配列の長さ：639

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

ハイボセティカル配列：NO

アンチセンス：NO

起源：生物名：ピロコッカス フリオサス (Pyrococcus furiosus)

配列：

ATGAAAGTAT TAGTTACCGG GTTTGAGCCG TTTGGAGGAG AGAAAATTAA CCCACCGGAA 60  
 AGAATAGCAA AGGATCTTGA CGGGATTAAG ATTGGAGATG CCAAGTATT TGGGAGAGTC 120  
 CTCCCAGTGG TCTTTGGGAA AGCCAAGGAA GTATTGGAGA AACATTAGA GGAGATAAAG 180  
 CCAGACATAG CAATTTCATGT GGGATTGGCC CCAGGAAGGA GCGCAATAAG TATAGAGAGG 240  
 ATAGCCGTCA ATGCTATTGA CGCTAGAATT CCGGATAATG AAGGGAAGAA GATTGAGGAC 300  
 GAGCCAATAG TCCAGGAGGC CCCAACGGCG TATTTCTCTA CACTTCCAAT AAAGAAGATC 360  
 ATGAAGAAGT TACACGAAAG AGGAATTCCC GCTTACATCT CAAACTCCGC TGGACTTTAT 420  
 CTCTGCAACT ACGTTATGTA CCTAAGCCTC CATCACTCAG CGACTAAAGG ATATCCAAAG 480  
 ATGAGCGGAT TTATACACGT CCCTTACATC CCAGAGCAGA TCATAGATAA GATAGGGAAG 540  
 GGCCAAGTGC CTCCAAGCAT GTGCTATGAG ATGGAGCTTG AAGCTGTAA AGTAGCCATA 600  
 GAGGTTGCGC TCGACCTGCA GGCATGCAAG CTTGGCACT 639

【0050】配列番号：3

配列の長さ：730

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

ハイボセティカル配列：NO

アンチセンス：NO

起源：生物名：ピロコッカス フリオサス (Pyrococcus furiosus)

配列：

GAGCTCGGTC ACGGTTATTT CTTTGTTGGA GAAACACAAA TTCCGTATCA TAGGATACTT 60  
 AAGGTTGTTA GAAAAGATGG GAGGGTAGTT TGGGAAAGCA GGAAGAGGGG GTTAAATGA 120  
 AAGTATTAGT TACCGGGTTT GAGCCGTTTG GAGGAGAGAA AATTAACCCC ACCGAAAGAA 180  
 TAGCAAAGGA TCTTGACGGG ATTAAGATTG GAGATGCCCA AGTATTTGGG AGAGTCCTCC 240  
 CAGTGGTCTT TGGGAAAGCC AAGGAAGTAT TGGAGAAAAC ATTAGAGGAG ATAAAGCCAG 300  
 ACATAGCAAT TCATGTGGGA TTGGCCCCAG GAAGGAGCGC AATAAGTATA GAGAGGATAG 360  
 CCGTCAATGC TATTGACGCT AGAATTCCGG ATAATGAAGG GAAGAAGATT GAGGACGAGC 420  
 CAATAGTCCC AGGAGCCCCA ACGGCGTATT TCTCTACACT TCCAATAAAG AAGATCATGA 480  
 AGAAGTTACA CGAAAGAGGA ATTCCCGCTT ACATCTCAAA CTCCGCTGGA CTTTATCTCT 540  
 GCAACTACGT TATGTACCTA AGCCTCCATC ACTCAGCGAC TAAAGGATAT CCAAAGATGA 600  
 CGGGATTAT ACACGTCCCT TACATCCCAG AGCAGATCAT AGATAAGATA GGAAGGGGCC 660

AAGTGCCTCC AAGCATGTGC TATGAGATGG AGCTTGAAGC TGTTAAAGTA GCCATAGAGG 720  
TTGGGCTCGA 730

【0051】配列番号：4

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GGGGTTAAAT TTAAAGTATT AGTTACCGGG 30

【0052】配列番号：5

配列：

ATGAAAGTAT TAGTTACCGG GTTTGAGCCG TTTGGAGGAG AGAAAATTAA CCCCACCGAA 60  
AGAATAGCAA AGGATCTTGA CGGGATTAAG ATTGGAGATG CCCAAGTATT TGGGAGAGTC 120  
CTCCAGTGG TCTTTGGGAA AGCCAAGGAA GTATTGGAGA AAACATTAGA GGAGATAAAG 180  
CCAGACATAG CAATTCATGT GGGATTGGCC CCAGGAAGGA GCGCAATAAG TATAGAGAGG 240  
ATAGCCGTCA ATGCTATTGA CGCTAGAATT CCGGATAATG AAGGGAAGAA GATTGAGGAC 300  
GAGCCAATAG TCCAGGAGC CCCAACGGCG TATTTCTCTA CACTTCCAAT AAAGAAGATC 360  
ATGAAGAAGT TACACGAAAG AGGAATTCCT GCTTACATCT CAAACTCCGC TGGACTTTAT 420  
CTCTGCAACT ACGTTATGTA CCTAAGCCTC CATCACTCAG CGACTAAAGG ATATCCAAAG 480  
ATGAGCGGAT TTATACACGT CCCTTACATC CCAGAGCAGA TCATAGATAA GATAGGGAAG 540  
GGCCAAGTGC CTCCAAGCAT GTGCTATGAG ATGGAGCTTG AAGCTGTAA AGTAGCCATA 600  
GAGGTTGCGC TCGAGGAGTT GTTATGAGAG CCAAATAGC TGTAGTCCTA ATTTTATTTT 660  
TCTTCTTTAG TGGGTGCA 678

【0053】配列番号：6

配列の長さ：208

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列：

Met Lys Val Leu Val Thr Gly Phe Glu Pro Phe Gly Gly Glu Lys  
1 5 10 15  
Ile Asn Pro Thr Glu Arg Ile Ala Lys Asp Leu Asp Gly Ile Lys  
20 25 30  
Ile Gly Asp Ala Gln Val Phe Gly Arg Val Leu Pro Val Val Phe  
35 40 45  
Gly Lys Ala Lys Glu Val Leu Glu Lys Thr Leu Glu Glu Ile Lys  
50 55 60  
Pro Asp Ile Ala Ile His Val Gly Leu Ala Pro Gly Arg Ser Ala  
65 70 75  
Ile Ser Ile Glu Arg Ile Ala Val Asn Ala Ile Asp Ala Arg Ile  
80 85 90  
Pro Asp Asn Glu Gly Lys Lys Ile Glu Asp Glu Pro Ile Val Pro  
95 100 105  
Gly Ala Pro Thr Ala Tyr Phe Ser Thr Leu Pro Ile Lys Lys Ile  
110 115 120  
Met Lys Lys Leu His Glu Arg Gly Ile Pro Ala Tyr Ile Ser Asn  
125 130 135  
Ser Ala Gly Leu Tyr Leu Cys Asn Tyr Val Met Tyr Leu Ser Leu  
140 145 150

配列の長さ：678

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

ハイボセティカル配列：NO

アンチセンス：NO

起源：生物名：ピロコッカス フリオサス (Pyrococcus  
furius)

配列の種類：ペプチド

起源：

生物名：ピロコッカス フリオサス (Pyrococcus furiosus)

His	His	Ser	Ala	Thr	Lys	Gly	Tyr	Pro	Lys	Met	Ser	Gly	Phe	Ile
					155				160					165
His	Val	Pro	Tyr	Ile	Pro	Glu	Gln	Ile	Ile	Asp	Lys	Ile	Gly	Lys
					170				175					180
Gly	Gln	Val	Pro	Pro	Ser	Met	Cys	Tyr	Glu	Met	Glu	Leu	Glu	Ala
					185				190					195
Val	Lys	Val	Ala	Ile	Glu	Val	Ala	Leu	Glu	Glu	Leu	Leu		
					200				205					

【図面の簡単な説明】

【図 1】 プラスミド p P G P 1 の制限酵素地図を示す図である。

【図 2】 プラスミド p P G P 2 の制限酵素地図を示す図である。

【図 3】 プラスミド p P G P 3 の制限酵素地図を示す図である。

【図 4】 プラスミド p P G P 6 の制限酵素地図を示す図である。

【図 5】 プラスミド p P G P 7 の制限酵素地図を示す図である。

【図 6】 プラスミド p P G P 8 の制限酵素地図を示す図である。

【図 7】 プラスミド p P G P 9 の制限酵素地図を示す図である。

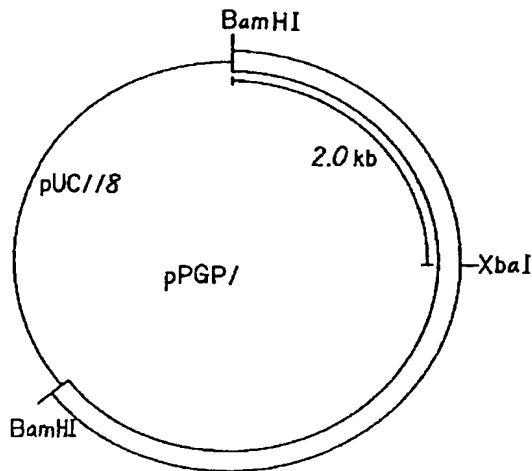
【図 8】 本発明の耐熱性ピログルタミルペプチダーゼの酵素標品の至適温度を示す図である。

【図 9】 本発明の酵素標品の至適 pH を示す図である。

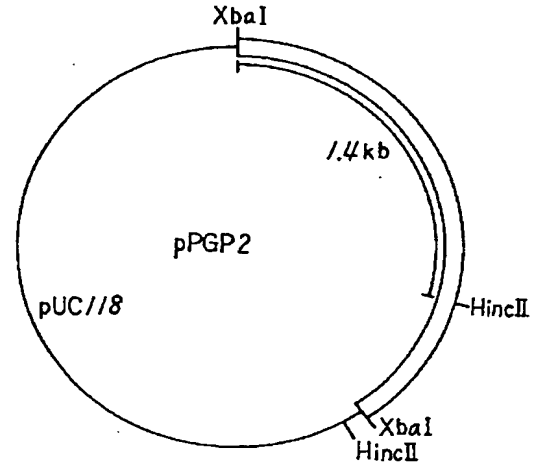
【図 10】 本発明の酵素標品の温度安定性を示す図である。

【図 11】 本発明の酵素標品の pH 安定性を示す図である。

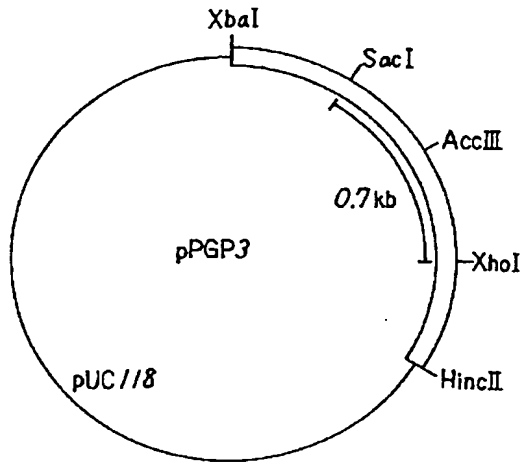
【図 1】



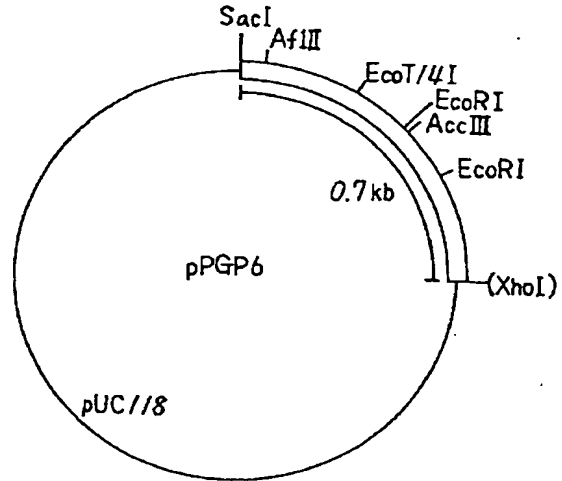
【図 2】



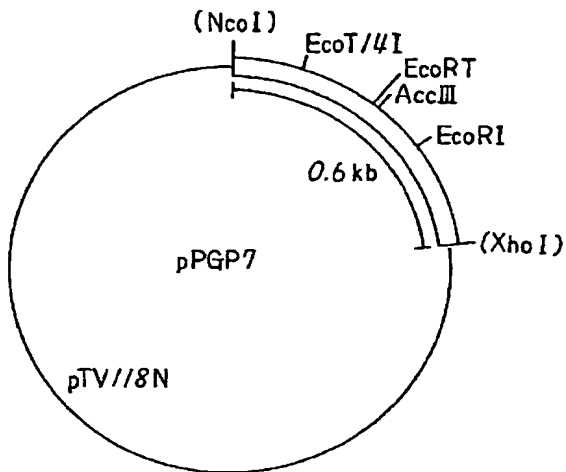
【図 3】



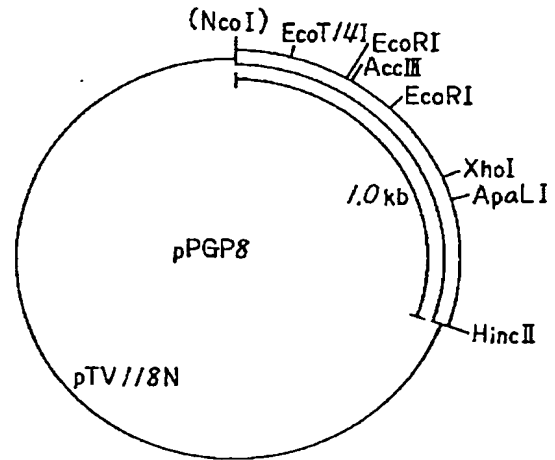
【図 4】



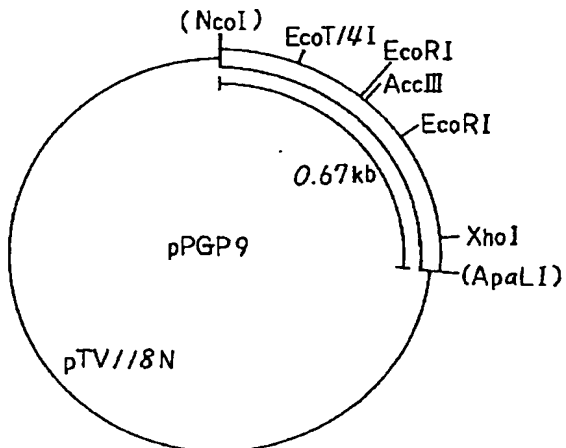
【図 5】



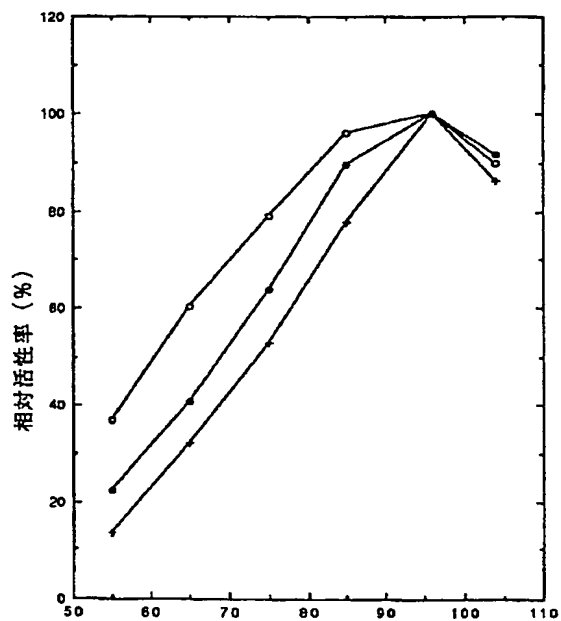
【図 6】



【図 7】

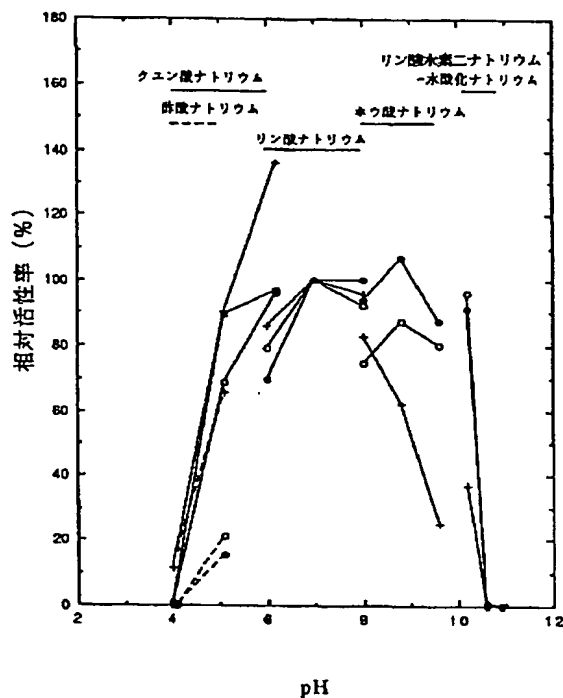


【図 8】



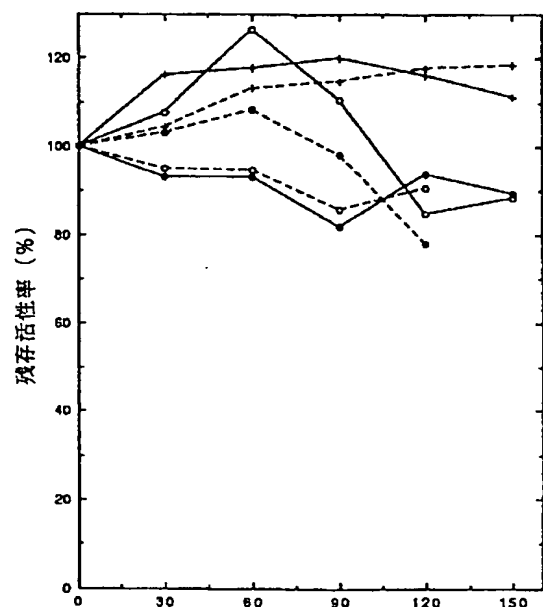
反応温度 (°C)

【図 9】



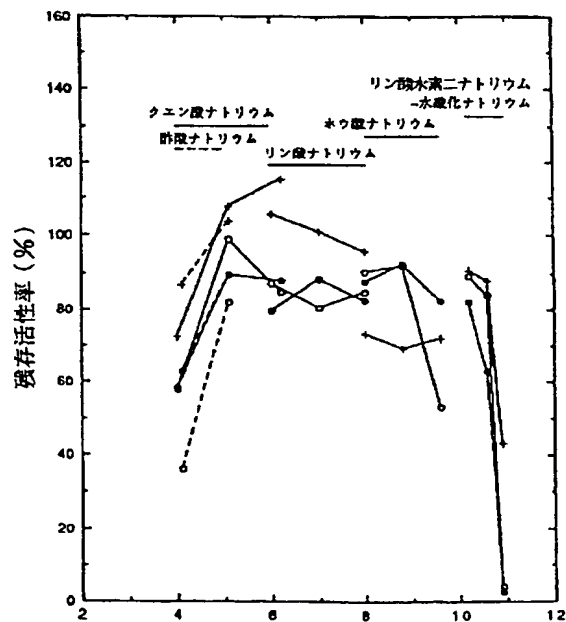
pH

【図 10】



熱処理時間 (分)

【図 11】



pH





## フロントページの続き

(72) 発明者 光永 研一  
滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造  
株式会社中央研究所内

(72) 発明者 網澤 進  
滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造  
株式会社中央研究所内  
(72) 発明者 加藤 郁之進  
滋賀県大津市瀬田 3 丁目 4 番 1 号 寶酒造  
株式会社中央研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**